

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8 - 7 3 5 0 6

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 3 月 19 日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C08B 37/00		P 7433-4C		
C07H 1/00				
C12P 19/12		7432-4B		
19/16		7432-4B		
19/18		7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 17 F D (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願平 7 - 1 2 2 9 4 9
(22) 出願日	平成 7 年 (1995) 4 月 25 日
(31) 優先権主張番号	特願平 6 - 1 6 5 7 8 7
(32) 優先日	平 6 (1994) 6 月 27 日
(33) 優先権主張国	日本 (J P)

(71) 出願人	0 0 0 1 5 5 9 0 8 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号
(72) 発明者	久保田 倫夫 岡山県岡山市四御神 1 番 3 0
(72) 発明者	杉本 利行 岡山県岡山市東畦 6 9 5 番地 4 4 号
(72) 発明者	三宅 俊雄 岡山県岡山市伊島町 1 丁目 3 番 2 3 号

(54) 【発明の名称】 非還元性糖質とその製造方法並びに用途

## (57) 【要約】

【目的】 分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースなどの非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質とその製造方法並びに用途を提供する。

【構成】 グルコース重合度 3 以上から選ばれる 1 種又は 2 種の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質、該糖質の製造方法並びに該糖質を含有せしめた組成物を主な構成とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項2】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物が、澱粉をDE15未満に液化したものに、澱粉枝切酵素及び／又は、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを、栄養培地中で、又は栄養培地外で作用させて得られる還元性澱粉部分分解物である請求項1記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項3】 澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをグルコース重合度3以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼとともに作用させる請求項2記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項4】 微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属及びテラバクター属から選ばれる微生物であることを特徴とする請求項1、2又は3記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項5】 微生物が、非還元性糖質生成酵素産生能とともにトレハロース遊離酵素産生能を有していることを特徴とする請求項1、2、3又は4記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項6】 非還元性糖質が、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求項1、2、3、4又は5記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項7】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる培養物から非還元性糖質、又は、これを含む糖質を採取することを特徴とする非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項8】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物が、澱粉を液化したものに、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを、栄養培地中で、又は、栄養培地外で作用させ得られる還元性澱粉部分分解物であることを特徴とする請求項7記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項9】 栄養培地に、グルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物を3w/v%以上含有せしめることを特徴とする請求項7又は8記載の非還元性糖質、又

は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項10】 微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属及びテラバクター属から選ばれる微生物であることを特徴とする請求項7、8又は9記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項11】 微生物が、非還元性糖質生成酵素産生能とともにトレハロース遊離酵素産生能を有していることを特徴とする請求項7、8、9又は10記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項12】 培養が、回分法、連続法又は半連続法で行われることを特徴とする請求項7、8、9、10又は11記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項13】 得られる培養物に、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させることを特徴とする請求項7、8、9、10、11又は12記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項14】 非還元性糖質が、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質又はトレハロースから選ばれる1種又は2種以上の非還元性糖質である請求項7、8、9、10、11、12又は13記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項15】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた組成物。

【請求項16】 非還元性糖質が、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質又はトレハロースから選ばれる1種又は2種以上の非還元性糖質である請求項15記載の組成物。

【請求項17】 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品であることを特徴とする請求項15又は16記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、非還元性糖質とその製造方法並びに用途に関し、詳細には、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質、及び該糖質の製造方法並びにその用途に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質

として、古くからトレハロース ( $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース) が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー (Advances in Carbohydrate Chemistry)』、第 18 巻、第 201 乃至 225 頁 (1963 年) アカデミック・プレス社 (米国) 及び『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology)』、第 56 巻、第 3213 乃至 3215 頁 (1990 年) などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースのような非還元性糖質は、アミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、含アミノ酸物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭 50-154485 公報で報告されている微生物菌体を用いる方法や、特開昭 58-216695 公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合せでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物菌体を用いる方法は、該菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当り 15w/w% (以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w% を単に % と略称する) 未満と低く、その上、これを抽出、精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼ及びトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いずれもグルコース-1リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至っていない。

【0004】これに関係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁(1992年)、「澱粉利用開発の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖転移、加水分解反応を用いた酵素的生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であると考えられてきた。

【0005】一方、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示すことが知られている。このような

澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント (Dextrose Equivalent, DE) として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【0006】このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、DEの大小に依存しており、還元性澱粉部分分解物とDEとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0007】還元性澱粉部分分解物とDEとの関係を断ち切る唯一の方法は、還元性澱粉部分分解物を高圧水素添加法などによって、その還元基を糖アルコールに変換して非還元性糖質にする方法である。しかし、この方法は、高圧オートクレーブを必要とし、多量の水素やエネルギーを消費するのみならず、防災上からも高度な安全施設や管理を必要としている。その上、得られる還元性澱粉部分分解物の糖アルコールは、原料の還元性澱粉部分分解物がグルコースのみからなるのに対し、グルコースとソルビトールとから構成される点で異なり、それを摂取することによって、一過性ではあるが、難消化、緩下の症状を起こす懸念もある。従って、還元性澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変換することなく、その還元力を低減若しくは消滅させる方法の確立が望まれる。

【0008】これを解決するために、本発明者等は、先に、特願平 5-349216 号明細書で、グルコース重合度 3 以上から選ばれる 1 種又は 2 種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素 (本酵素を、本明細書を通じて、非還元性糖質生成酵素と称する。) を開示し、本非還元性糖質生成酵素を利用して、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質とこれを含む低還元性糖質並びにこれら糖質からのトレハロースの製造方法を確立した。

【0009】また、本発明者等は、特願平 6-79291 号明細書で、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する新規トレハロース遊離酵素 (本酵素を、本明細書を通じて、トレハロース遊離酵素と称する。) を開示し、前述の非還元性糖質生成酵素と本トレハロース遊離酵素とを併用して還元性澱粉部分分解物から比較的高収量のトレハロースの製造方法を確立した。しかしながら、微生物を培養して該両酵素を産生せしめる培養時間に加えて、酵素回収の時間、還元性澱粉部分分解物からの非還元性

糖質への酵素反応時間を必要とし、工業実施する上でかなりの長時間を要する欠点のあることが判明した。還元性澱粉部分分解物から非還元性糖質を生産するに際し、該酵素の生産をも含めて、より簡便に、容易に実施する非還元性糖質の製造方法の確立が望まれる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、還元性澱粉部分分解物からの非還元性糖質を、簡便に、短時間に製造しうる新規方法を確立し、併せて、その用途を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題を解決するために、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物の培養状況と該酵素の産生状況について鋭意研究を続けてきた。その結果、該微生物は、非還元性糖質生成酵素をかなり早期から産生していることを見出し、培養中の栄養培地に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を共存せしめることにより、容易に非還元性糖質を生成、蓄積することを見出し、本発明を完成した。

【0012】すなわち、本発明は、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質、及び該糖質の製造方法、並びに、該糖質を含有せしめた組成物を確立するものである。本発明において、還元性澱粉部分分解物としては、とりわけ、澱粉を液化したものに澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを、栄養培地中で、又は、栄養培地外で作用させたものが好適であり、また、微生物としては、とりわけ、非還元性糖質生成酵素産生能及びトレハロース遊離酵素産生能を有している微生物の利用が、トレハロース生産にとって極めて有利であることが判明した。このようにして得られる非還元性糖質やこれを含む低還元性糖質は、安定性が高く、取扱いが容易で、広範な用途に利用でき、例えば、飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0013】まず、本発明で用いる非還元性糖質生成酵素としては、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成する酵素であればよく、例えば、特願平5-349216号明細書に開示されるリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属及びテラバクター属に属する微生物由来の酵素が好適である。また、トレハロース遊離酵素としては、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素を作用させて生成される $\alpha$ -グリコシルトレハロースを、その

トレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する酵素、例えば、特願平6-79291号明細書に開示されているリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属、及びミクロコッカス属に属する微生物由来の酵素が好適である。

【0014】微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、非還元性糖質生成酵素を産生しうる栄養培地であって、非還元性糖質生成のための基質となるグルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有するものが採用される。必要に応じて、微生物が資化しうる他の炭素源、例えば、グルコース、フラクトース、マルトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜などの糖質、更には、クエン酸、コハク酸などの有機酸、又は、その塩を併用することも随意である。培地に含有せしめるグルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物の濃度は、比較的高いのが望ましく、3w/v%以上、望ましくは、5乃至40w/v%、更に望ましくは、約10乃至30w/v%である。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物及び、例えば、尿素、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【0015】培養は、通常、温度4乃至40℃、好ましくは20乃至37℃、pH4乃至10、好ましくは5乃至9から選ばれる条件で好氣的に行われる。培養時間は微生物が増殖し得る以上の時間であればよく、好ましくは10乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5乃至20ppmが好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を追加したり、また、ファーマンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養、連続培養又は半連続培養のいずれでもよい。

【0016】このようにして、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養して、培養物中に非還元性糖質を生成、蓄積せしめることができる。また、必要ならば、別に調製した非還元性糖質生成酵素を、培養中の栄養培地に補足して、非還元性糖質の生成速度を高めることも、また、別に調製したトレハロース遊離酵素を、培養中の栄養培地に加えてトレハロースを生成、蓄積することも有利に実施できる。また、アニオン界面活性剤、非イオン界面活性剤などの界面活性剤及び／又は、卵白リゾチームなどの溶菌酵素を培養中の栄養培地に加えて

トレハロースの生成速度を高めることも有利に実施できる。このようにして、生成、蓄積された非還元性糖質は、培養物を濾過又は遠心分離するなどにより、菌体を分離し、得られる液体部分に含まれる。

【0017】非還元性糖質を含有する培養物は、まず、公知の固液分離法、例えば、濾過又は遠心分離などにより、除菌液とし、これを常法に従って、濃縮し、活性炭で脱色、H型、OH型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、培養物をそのまま平膜又は中空糸膜などの膜濾過にかけ、菌体などの不溶物とともに溶性の蛋白質、核酸などの高分子物を除去するか、又は、予め、遠心分離などにより不溶物を除去し、次いで、膜濾過により溶性高分子物を除去した後、常法に従って、濃縮、脱色、脱塩して精製し、非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質製品を有利に製造することができる。次に、本発明の非還元性糖質生成に寄与している酵素について説明する。

【0018】酵素活性は、培養物の菌体及び除菌液いずれにも認められ、菌体及び除菌液を粗酵素液として採取することも、また、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫酸塩析法、アセトン及びアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜など膜濃縮法などが採用される。

【0019】更に、除菌液及びその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにポリエチレンイミン、グルタルアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることもできる。例えば、超音波による破砕法、ガラスビーズ及びアルミナによる機械的破砕法、フレンチプレスによる破砕法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離又は膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0020】本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することができる。一例として、培養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、東ソー株式会社製『DEAE-トヨパール』などを用いた陰イオン交換カラムクロマ

トグラフィー、続いて、同社製『ブチルトヨパール』などを用いた疎水カラムクロマトグラフィー、同社製『トヨパール HW-55』などを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一の酵素を得ることができる。

【0021】このようにして得られる非還元性糖質生成酵素は、一般的には、例えば、下記の理化学的性質を有する。

#### (1) 作用

10 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成する。

#### (2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約76,000乃至87,000ダルトン。

#### (3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.6乃至4.6。

#### (4) 至適温度

20 pH7.0、60分間反応で、35乃至40℃付近。

#### (5) 至適pH

40℃、60分間反応で、pH約6.4乃至7.2。

#### (6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、35乃至40℃付近まで安定。

#### (7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.5乃至11.0。

【0022】非還元性糖質生成酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース1.25w/v% (50 mMリン酸緩衝液、pH7.0) 4mlに酵素液を1ml加え40℃で60分間反応させた後、100℃で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に脱イオン水で10倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義した。

【0023】また、前述のようにして得られるトレハロース遊離酵素は、一般的には、例えば、下記の理化学的性質を有する。

#### (1) 作用

40  $\alpha$ -グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

#### (2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

#### (3) 等電点

50 アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至

至 4. 6。

(4) 至適温度

pH 7. 0、30 分間反応で、35 乃至 45℃ 付近。

(5) 至適 pH

40℃、30 分間反応で、pH 約 6. 0 乃至 7. 5。

(6) 温度安定性

pH 7. 0、60 分間保持で、30 乃至 45℃ 付近まで安定。

(7) pH 安定性

25℃、16 時間保持で、pH 約 5. 0 乃至 10. 0。 10

【0024】トレハロース遊離酵素の活性は次のようにして測定する。基質としてマルトトリオシルトレハロース (別名、 $\alpha$ -マルトテトラオシル  $\alpha$ -グルコシド) 1. 25 w/v % (50 mM リン酸緩衝液、pH 7. 0) 4 ml に酵素液を 1 ml 加え 40℃ で 30 分間反応

させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ 100℃ で 10 分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1 分間に  $1 \mu\text{mole}$  のグルコースに相当する 20 還元力を増加させる酵素量を 1 単位と定義する。

【0025】次に、本発明で用いる澱粉枝切酵素は、澱粉を比較的低 DE に液化したもの、望ましくは、DE 15 未満の液化物に作用し、澱粉の枝分かれ結合を加水分解する酵素であって、公知のブルナーゼ、イソアミラーゼなどが有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。また、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼは、澱粉を比較的低 DE に液化したもの、望ましくは、DE 15 未満の 30 液化物に作用し、澱粉糖を糖転移し、不均化 (disp roportionation) 反応する酵素であって、公知のパチルス属、クレブシーラ属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。

【0026】また、前述の澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼに加えて、必要に応じて、他のアミラーゼ、望ましくは、澱粉を比較的低 DE に液化したものに作用して、主としてグルコース重合度 3 以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼ、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルトトリオース生成 40 アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ、マルトヘプタオース生成アミラーゼなどを用いることも有利に実施できる。

【0027】本発明で使用される澱粉は、とうもろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。澱粉を液化するには、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは濃度 10% 以上、更に望ましくは約 20 乃至 50% とし、これを加熱して機械的に液 50

化しても、酸又は酵素で液化してもよい。液化の程度は、比較的低いものが適しており、望ましくは DE 15 未満、更に望ましくは DE 10 未満のものが好適である。酸で液化する場合には、例えば、塩酸、磷酸、蔞酸などで液化し、その後、炭酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸ナトリウムなどで必要 pH に中和して利用すればよい。酵素で液化する場合には、 $\alpha$ -アミラーゼ、とりわけ、耐熱性の液化型  $\alpha$ -アミラーゼの使用が適している。必要に応じて、前述のグルコース重合度 3 以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼを併用することも随意である。

【0028】このようにして得られるグルコース重合度 3 以上から選ばれる 1 種又は 2 種以上の還元性澱粉部分分解物は、本発明の培養方法による非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質用の糖源として有利に利用できる。また、市販の還元性澱粉部分分解物を利用することも有利に実施できる。該還元性澱粉部分分解物を栄養培地に含有せしめる時期は、非還元性糖質が生成できる時期であればよく、培養初期から含有せしめておくことも、培養途中から含有せしめることも随意である。また、連続又は半連続培養する場合には、例えば、非還元性糖質を生成せしめた培養培地の一部を抜き出し、これと同容量の該還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地を追加して培養すればよい。

【0029】また、該還元性澱粉部分分解物は、澱粉を液化したものに澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを作用させて得られるものが特に適しており、例えば、培養を、別に調製した該還元性澱粉部分分解物を添加した栄養培地で行うことも、澱粉液化溶液とともに澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを共存せしめた栄養培地で行うことも、いずれも有利に実施できる。

【0030】酵素の使用量は、作用条件、反応時間によって適宜選べばよいが、通常、基質である還元性澱粉部分分解物に対して、固形物グラム当たり、澱粉枝切酵素の場合、約 1 乃至 2, 000 単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約 0. 05 乃至 100 単位から選ばれる。このようにして得られる非還元性糖質を含む培養物は、澱粉を液化したものに、澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼが培養物中の菌体又は培養液に含まれる非還元性糖質生成酵素又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素とともに作用するため、比較的低分子の  $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び/又は  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドを多量に含有するか、又はトレハロースを多量に含有する特長を有している。なお、 $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドは、本出願人が、特願平 6-54377 号明細書で開示した  $\alpha$ -オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシド



を含む呼称である。

【0031】培養物は、常法により、濾過、遠心分離などして菌体などの不溶物を除去した後、濃縮、活性炭で脱色、H型、OH型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコール及びアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、酵母での発酵処理、アルカリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの方法を1種又は2種以上組み合わせることで精製することにより、最高純度の非還元性糖質製品を得ることも容易である。

【0032】とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去し、目的の非還元性糖質含量を向上させた低還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0033】このようにして得られた本発明のトレハロース構造を有する非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を、必要により、アミラーゼ、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどや、又は $\alpha$ -グルコシダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。

【0034】とりわけ、本発明の非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させることにより容易にトレハロースを製造することができる。即ち、これらの非還元性又は低還元性糖質にグルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶又は無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0035】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約60%以上、濃度約65乃至90%のトレハロース高含有液を助晶缶にとり、必要に応じて、0.1乃至20%の種晶共存下で、温度95℃以下、望まし

くは10乃至90℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。また、減圧濃縮しながら晶析させる連続晶析法を採用することも有利に実施できる。マスキットからトレハロース含水結晶又はこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0036】分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜(母液)とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度70乃至85%、晶出率20乃至60%程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、60乃至100℃の熱風で乾燥し、次いで30乃至60℃の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分10乃至20%、晶出率10乃至60%程度のマスキットを約0.1乃至3日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0037】また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で50乃至160℃、望ましくは80乃至140℃の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0038】このようにして製造される本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元力が低いにもかかわらず低粘度であり、平均グルコース重合度が低いものの場合には、良質で上品な甘味を有している。

【0039】更に、アミラーゼ、例えば、すい臓由来 $\alpha$ -アミラーゼにより分解し、低分子非還元性オリゴ糖や低分子マルトオリゴ糖を生成し、また、これらオリゴ糖も、 $\alpha$ -グルコシダーゼや小腸酵素でも容易に分解し、グルコース及びトレハロースを生成し、更に、生成したトレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリー源として利用される。虫歯誘発菌などによ



って、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の晶出防止性、難醗酵性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0040】また、本発明のトレハロースは、経管栄養剤、輸液剤などとして非経口的に使用され、毒性、副作用の懸念もなく、よく代謝、利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用することができる。また、安定な甘味料であることにより、結晶高含有製品の場合には、ブルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。

【0041】また、無水結晶トレハロースの場合には、食品、医薬品、化粧品、その原材料、又は加工中間物などの含水物の脱水剤としても有利に利用でき、安定で高品質の粉末、顆粒、錠剤など固状物を容易に製造することができる。

【0042】従って、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤、脱水剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0043】本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、 $\text{L}$ -アスパルチル- $\text{L}$ -フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0044】また、本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのまま、又は必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0045】また、本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0046】例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし

酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒースシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0047】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スブレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べつたら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、コーヒーマ、紅茶、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席するこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品、乾燥食品などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0048】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。

【0049】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンI Iなどのリンホカイン、イン

シュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エритроポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、スプレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、10 プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロボリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状又は固状の健康食品や医薬品などに容易に製造できることとなる。

【0050】以上述べたような各種組成物に非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめる方法20 は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0051】まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ M-11及びアルスロバクター・スピーシーズ Q36からの非還元性糖質生成酵素について説明し、次いで、公知微生物からの非還元性糖質生成酵素について説30 明する。

#### 【0052】

【実験1 リゾビウム・スピーシーズ M-11からの非還元性糖質生成酵素の生産】マルトース2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%及び水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ40 M-11 (FERM BP-4130)を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0053】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて滅菌、冷却して温度30℃とした後、種培養液1w/v%を接種し、温度30℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、約24時間通気攪拌培養した。培養液の本酵素活性は約1.5単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には約0.6単位/mlの酵素活性が、また、培養液上清には約0.9単位/mlの酵素活性が認められた。

#### 【0054】

【実験2 酵素の精製】実験1で得られた培養液約18lを超高圧菌体破碎装置、大日本製薬株式会社製『ミニラボ』で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離(10,000rpm,30分間)することにより、約16lの上清を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離して上清を回収した。

【0055】更に、その液に飽和度0.6になるように硫酸を溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(360ml)を2回に分けて、『DEAE-トヨパール』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。

【0056】本酵素は『DEAE-トヨパール』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。得られる酵素活性画分を、2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、得られる上清を東ソー株式会社製『ブチルトヨパール 650』を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。吸着した本酵素を硫酸2Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムから溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、『トヨパールHW-55』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行い、酵素活性画分を回収した。精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

#### 【0057】

【表1】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	26,800		100
破砕後の上清	20,300	0.10	76
硫酸塩析後の透析液	16,100	0.32	60
イオン交換カラム溶出液	11,300	5.5	42
疎水カラム溶出液	5,730	98	21
ゲル濾過溶出液	3,890	195	15

【0058】表1の工程でゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度7.5%)を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一な純度の高い標品であった。

【0059】

【実験3 酵素の性質】実験2で得られた精製酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度10%)を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約77,000乃至87,000ダルトンであった。

【0060】精製酵素標品を2%アンフォライン含有ポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.6乃至4.6であった。

【0061】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響は活性測定方法に準じて調べた。結果を図1(温度の影響)、図2(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、60分間反応で、40℃付近、至適pHは、40℃、60分間反応で、約7.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に6.0分間保持し、水冷

した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3(温度安定性)、図4(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は40℃付近まで安定であり、pH安定性は約6乃至9であった。

【0062】

【実験4 非還元性糖質の調製】基質として、グルコース、マルトース、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、又はマルトヘプタオースの20%水溶液を調製し、それぞれに実験2で得られた精製酵素を基質固形物グラム当たり2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、和光純薬工業株式会社製『ワコービーズ WB-T-330』を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。高速液体クロマトグラフィーは、室温下で行い、溶離液として水を流速0.5ml/分で流し、示差屈折計、東ソー株式会社製『RI-8012』で分析した。その結果を表2に示す。

【0063】

【表2】

基質	反応物	HPLC溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコース	グルコース	33.4	100.0
マルトース	マルトース	28.5	100.0
マルトトリオース	PI	23.3	35.0
	マルトトリオース	25.9	65.0
マルトテトラオース	PII	21.6	85.6
	マルトテトラオース	24.1	14.4
マルトペンタオース	PIII	19.7	92.7
	マルトペンタオース	22.6	7.3
マルトヘキサオース	PIV	18.7	93.5
	マルトヘキサオース	21.4	6.5
マルトヘプタオース	PV	17.8	93.4
	マルトヘプタオース	21.0	6.6

(注) 表中、PI、PII、PIII、PIV、PVは、それぞれの基質、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースから新たに生成した糖質を意味する。

【0064】表2の結果から明らかなように、反応物中には残存するそれぞれの基質と新たに生成したそれぞれの糖質PI、PII、PIII、PIV、PVからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されない。それぞれの生成率はグルコース重合度3のPIが比較的低いものの、グルコース重合度4以上のPII、PIII、PIV、PVは85%以上の高い生成率であることが判明した。なお、グルコース、マルトースからは、新たな糖質を生成しないことが判明した。

【0065】それぞれの反応物から新たに生成した糖質を精製するため、脱色、脱塩、濃縮後、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂、東京有機化学工業株式会社製『XT-1016』（架橋度4%）を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、新たに生成した糖質含量97%以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を真空乾燥し、それぞれ高純度糖質標品を調製した。基質原料に対する収率は、固形物換算で、それぞれPIで約9%、PIIで約65%、PIIIで約82%、PIVで約80%、PVで約77%であった。その純度は、それぞれPIで97.5%、PIIで98.6%、PIIIで99.5%、PIVで98.4%、PVで98.4%であった。

【0066】またこれらの新たに生成した高純度糖質標

品の還元力をソモギー・ネルソン法で測定し、DEで表した。結果は表3にまとめた。

【0067】

【表3】

糖質標品	純度 (%)	DE
PI	97.5	0.83
PII	98.6	0.35
PIII	99.5	0.10
PIV	98.4	0.27
PV	98.4	0.23

【0068】表3の結果から明らかなように、いずれの標品にも僅かな還元力しか認めなかった。その僅かな還元力は、その標品中に微量に混入、残存している基質由来の還元性マルトオリゴ糖に起因するものと推定され、新たに生成した糖質はいずれも実質的に非還元性であると判断される。

【0069】

【実験5 メイラード反応】実験4において調製した糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVの10%とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)とを含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、それぞれの原料であるマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース

ス、マルトヘキサオース、又はマルトヘプタオースを用いて、同様に、処理し、480nmにおける吸光度を測定した。それらの結果を表4に示す。

【0070】

【表4】

糖質標品	着色度 (480nm)	判定
PI	0.027	本発明
PII	0.018	本発明
PIII	0.012	本発明
PIV	0.016	本発明
PV	0.015	本発明
マルトトリオース	0.623	対照
マルトテトラオース	0.475	対照
マルトペンタオース	0.369	対照
マルトヘキサオース	0.318	対照
マルトヘプタオース	0.271	対照

【0071】表4の結果から明らかなように、新たに生成した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVのいずれもメイラード反応による着色度は極めて低く、それぞれ原料の基質であるマルトオリゴ糖の着色度の僅かに3乃至6%程度であり、本発明の新規酵素によって生成する非還元性糖質はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが判明した。

【0072】

【実験6 グルコアミラーゼによる酵素分解】実験4において調製した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV又は、PVのそれぞれ50mgを、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)1mlに溶解し、1単位のグルコアミラーゼ(生化学工業株式会社製)を加え、40℃で6時間保ち、酵素分解した後、高速液体クロマトグラフィーで分解物を分析したところ、いずれの標品からも分解物としてグルコースとトレハロースのみが検出された。検出されたグルコース含量、トレハロース含量、その組成モル比の結果を表5に示す。

【0073】

20 【表5】

糖質標品	グルコース (%)	トレハロース (%)	組成モル比 (グルコース/トレハロース)
PI	36.2	63.8	1.07
PII	52.0	48.0	2.08
PIII	61.4	38.6	3.02
PIV	68.3	31.7	4.09
PV	72.9	27.1	5.11

【0074】表5の結果から明らかなように、グルコアミラーゼにより、非還元性糖質PIはグルコース1分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIIはグルコース2分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIIIはグルコース3分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIVはグルコース4分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PVはグルコース5分子とトレハロース1分子に分解されることが判明した。

【0075】また、グルコアミラーゼの反応特性を考慮すると、これら非還元性糖質の構造はトレハロース分子にグルコース分子が $\alpha-1, 4$ -結合、もしくは $\alpha-1, 6$ -結合で結合した糖質で、それぞれ、PIはトレハロース1分子にグルコース1分子が結合したグルコース重合度3の非還元性糖質で、PIIはトレハロース1分子にグルコース2分子が結合したグルコース重合度4の非還元性糖質で、PIIIはトレハロース1分子にグルコース3分子が結合したグルコース重合度5の非還元性糖質で、PIVはトレハロース1分子にグルコース4分子が結合したグルコース重合度6の非還元性糖質で、PVはトレハロース1分子にグルコース5分子が結合し

たグルコース重合度7の非還元性糖質であると判断される。なお、同様に、非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVに $\beta$ -アミラーゼを作用させたところ、非還元性糖質PI、PIIは分解されず、PIIIはマルトースの1分子とPIの1分子に分解され、PIVはマルトースの1分子とPIIの1分子に分解され、PVはマルトースの2分子とPIの1分子に分解されることが判明した。

【0076】以上の結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素による反応は、基質の低分子化及び高分子化を伴わない、換言すれば、グルコース重合度の変化を伴わない、分子内変換反応と判断され、また、この非還元性糖質生成酵素によって生成した非還元性糖質、PI、PII、PIII、PIV及びPVは、それぞれ、 $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースで示される $\alpha$ -グリコシルトレハロース( $G_n-T$ :但し、Gはグルコース残基を意味し、nは1以上の整数を意味し、Tは $\alpha$ -、 $\alpha$ -トレハロースを意味する。)であると判断される。

## 【0077】

【実験7 各種の酵素による分解】実験4において調製した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVのそれぞれを基質として、ブタすい臓由来 $\alpha$ -アミラーゼ（シグマ社販売）、コメ由来 $\alpha$ -グルコシダーゼ（同社販売）、又はラット小腸アセトン粉末酵素（同社販売）のそれぞれに作用させた後、分解物の糖組成を高速液体クロマトグラフィーで分析した。 $\alpha$ -アミラーゼの反応は、それぞれの基質10mgを、50mMリン酸緩衝液（pH6.9）1mlに溶解し、これに、酵素活性1単位加え、37℃で18時間保って行っ

た。 $\alpha$ -グルコシダーゼの反応は、50mM酢酸緩衝液（pH4.0）を用いた以外、 $\alpha$ -アミラーゼの場合と同様の条件で行った。ラット小腸アセトン粉末酵素の場合も、50mMマレイン酸緩衝液（pH6.0）を用いた以外、 $\alpha$ -アミラーゼの場合と同様の条件で行った。 $\alpha$ -アミラーゼによる分解物の糖組成を以下の表6に、 $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成を以下の表7、表8に示す。

## 【0078】

【表6】

糖質標品	$\alpha$ -アミラーゼによる分解物の糖組成 (%)				
	PI	PII	G3	G2	G1
PI	97.3	0	2.3	0.4	0
PII	0	98.8	0.4	0.8	0
PIII	61.0	4.8	0	33.0	1.2
PIV	47.2	3.3	40.4	7.5	1.6
PV	10.2	44.9	35.3	8.6	1.0

（注）表中、G3はマルトトリオースを、G2はマルトースを、G1はグルコースを意味する。

## 【0079】

【表7】

糖質標品	$\alpha$ -グルコシダーゼによる分解物の糖組成		
	グルコース (%)	トレハロース (%)	その他 (%)
PI	36.5	63.0	0.5
PII	52.1	47.6	0.3
PIII	61.7	38.1	0.2
PIV	69.5	30.2	0.3
PV	71.4	28.3	0.3

## 【0080】

【表8】

糖質標品	ラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成		
	グルコース (%)	トレハロース (%)	その他 (%)
PI	37.2	62.4	0.4
PII	52.5	47.1	0.4
PIII	62.0	37.6	0.4
PIV	68.8	30.8	0.4
PV	73.4	26.5	0.1

【0081】表6の結果から明らかなように、糖質標品、PI及びPIIは、 $\alpha$ -アミラーゼによりほとんど分解されないものの、糖質標品、PIII、PIV、及びPVは $\alpha$ -アミラーゼにより低分子のオリゴ糖、PI、PII、マルトトリオース、マルトース及びグルコースにまで分解されることが判明した。

【0082】また、表7、表8の結果から明らかなよう

に、糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVいずれも $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により、実験6のグルコアミラーゼの場合と同様に、グルコースとトレハロースにまで分解されることが判明した。

【0083】また、同様に $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素によって分解されたそれぞれの

反応物に、更に、1単位のブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社販売）を加え、pH 5.7、37℃で18時間作用させ、高速液体クロマトグラフィー法で糖組成を分析したところ、糖質標品、P I、P I I、P I I I、P I V、P Vいずれの場合も、 $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により生成したトレハロースはトレハラーゼによりグルコースにまで分解することが判明した。

【0084】上述のように、

(1) 非還元性糖質生成酵素は、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から、そのグルコース重合度を変化することなく、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成している。

(2) 非還元性糖質P Vは、 $\alpha$ -アミラーゼにより、主に非還元性糖質P I Iとマルトトリオースを生じ、非還元性糖質P I Iは、グルコアミラーゼにより、トレハロース1分子とグルコース2分子を生じている。これらの結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素は、還元性澱粉部分分解物の還元性末端を非還元性のトレハロース構造に分子内変換する全く新しい作用機作の酵素であると判断される。

【0085】

【実験8 急性毒性】7週齢のdd系マウスを使用し、実験4において調製した非還元性糖質標品、P I、

P I I、P I I I、P I V、又はP Vを経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、これら非還元性糖質はいずれも低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、それらのLD<sub>50</sub>値は、いずれも50g/kg以上であった。

【0086】

【実験9 アルスロバクター・スピーシーズ Q36からの非還元性糖質生成酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 (FERM BP-4316) を用いた以外は、実験1と同様にファーメンターで約72時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は、約1.2単位/mlであった。実験1と同様にして菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、それぞれ約0.5単位/ml及び約0.7単位/mlであった。

【0087】

【実験10 酵素の精製】実験9の方法で得られた培養液約18lを用いて、実験2と同様に精製した。精製の各工程結果は表9にまとめた。

【0088】

【表9】

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	21,600		100
破砕後の上清	17,500	0.14	81
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.41	73
イオン交換カラム溶出液	12,600	6.5	58
疎水カラム溶出液	8,820	98	41
ゲル濾過溶出液	5,290	201	24

【0089】表9の工程で、ゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品を、実験2の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0090】

【実験11 酵素の性質】実験10で得られた精製酵素標品を、実験3の場合と同様に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約76,000乃至86,000ダルトンであった。また、本精製酵素標品の等電点を実験3の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、pI約3.6乃至4.6であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響、及び本酵素の温度安定性、pH安定性について、実験3の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響

を図5に、pHの影響を図6に、温度安定性を図7に、pH安定性を図8に示した。

【0091】図から明らかなように酵素の至適温度は40℃付近、至適pHは約6.5乃至7.0である。温度安定性は40℃付近までであり、pH安定性は約6.0乃至9.5である。

【0092】

【実験12 非還元性糖質の調製】実験10で得られた精製酵素標品を用いて、実験4及び実験6の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成することが判明した。



【0093】

【実験13 公知微生物からの非還元性糖質生成酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明の非還元性糖質生成酵素生産能の確認された表10に示す特定の微生物を、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) ATCC19420の場合に37℃で培養した以外は、実験1の場合と同様にファーメンターで27℃で72時間培養し

た。それぞれの培養液約18lを用いて、実験2の場合と同様に、培養液を破碎装置にかけ、その上清を硫酸塩析、透析し、更にイオン交換カラムにかけ、部分精製酵素標品を得、その性質を調べた。結果を表10にまとめた。

【0094】

【表10】

微生物名	イオン交換カラム 溶出液 (単位)	至適温度	至適pH	温度安定性	pH安定性
Brev. h.	2,700	35℃付近	約8.5	35℃付近まで	約5.5乃至11
Flav. a.	216	35℃付近	約8.5乃至6.9	35℃付近まで	約8.0乃至9.5
Micr. l.	1,730	35℃付近	約8.4乃至6.8	35℃付近まで	約8.5乃至8.0
Micr. r.	1,340	35℃付近	約8.8乃至7.2	35℃付近まで	約8.0乃至11
Curt. c.	1,280	30℃付近	約8.4乃至6.8	35℃付近まで	約8.5乃至7.8
Myc. s.	358	35℃付近	約8.5	35℃付近まで	約8.0乃至9.0
Terr. t.	1,050	35℃付近	約8.5乃至7.0	35℃付近まで	約8.0乃至9.6
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	11,300	40℃付近	約7.0	40℃付近まで	約8.0乃至9.0
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	12,600	40℃付近	約6.5乃至7.0	40℃付近まで	約6.0乃至9.5

(注) 表中、微生物名の略記は、下記の微生物を意味する。

Brev. h.: *Brevibacterium helvolum* (ATCC11822)  
 Flav. a.: *Flavobacterium aquatile* (IFO3772)  
 Micr. l.: *Micrococcus luteus* (IFO3084)  
 Micr. r.: *Micrococcus roseus* (ATCC186)  
 Curt. c.: *Curtobacterium citreum* (IFO15231)  
 Myco. s.: *Mycobacterium smegmatis* (ATCC19420)  
 Terr. t.: *Terrabacter tumescens* (IFO12980)

【0095】また、これら公知菌由来の部分精製酵素を用いて、実験12の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認を行ったところ、いずれの酵素もリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物からα-グリコシルトレハロースを生成することが判明した。

【0096】次に、新規微生物リゾビウム・スピーシー

ズ M-11及びアルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素について説明し、次いで、公知微生物からのトレハロース遊離酵素について説明する。

【0097】

【実験14 リゾビウム・スピーシーズ M-11からのトレハロース遊離酵素の生産】澱粉部分分解物、松谷化学工業株式会社製『パインデックス#4』2.0w/

v%, ペプトン 0.5w/v%, 酵母エキス 0.1w/v%, リン酸二ナトリウム 0.1w/v%, リン酸一カリウム 0.1w/v% 及び水からなる液体培地を pH 7.0 に調整した。500ml 容三角フラスコにこの培地を約 100ml ずつ入れ、オートクレーブで 120℃ で 20 分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) を接種し、27℃、130rpm で 24 時間培養したものを種培養液とした。

【0098】容量 30l のファーマンターに種培養の場合と同組成の培地約 20l を入れて殺菌、冷却して温度 27℃ とした後、種培養液 1w/v を接種し、温度 27℃、pH は 6.0 乃至 8.0 に保ちつつ、約 72 時間通気攪拌培養した。

【0099】培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約 1.5 単位/ml で、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約 2 単位/ml であった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約 0.6 単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約 0.8 単位/ml 認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約 0.9 単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約 1.2 単位/ml 認められた。

【0100】

【実験 15 酵素の精製】実験 14 の方法で得られた培養液約 18l を超高压菌体破碎装置『ミニラボ』で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離 (10,000rpm、30 分間) することにより、約 16l の遠心上清液を得た。その液に飽和度 0.2 になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、1 時間放置した後、遠心分離 (10,000rpm、30 分間) することにより上清を回収した。

【0101】更に、その液に硫酸を飽和度 0.6 になる

ように溶解させ、4℃、24 時間放置した後、遠心分離して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた後、同じ緩衝液に対して 24 時間透析し、遠心分離し、不溶物を除いた。その透析液 (360ml) を 2 回に分けて、

『DEAE-トヨパール』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量 300ml) を行った。

【0102】本発明のトレハロース遊離酵素、非還元性糖質生成酵素とも『DEAE-トヨパール』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから異なる食塩濃度においてそれぞれ溶出した。『DEAE-トヨパール』からの溶出パターンを図 9 に示す。非還元性糖質生成酵素は食塩濃度約 0.2M で、トレハロース遊離酵素は食塩濃度約 0.3M で溶出し、それぞれの酵素活性画分を回収し、以下、両酵素を別々に精製した。

【0103】非還元性糖質生成酵素活性画分を 2M 硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離し不溶物を除き、得られる上清を『ブチルトヨパール 650』を用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量 300ml) を行った。吸着した本酵素を 2M から 0M 硫酸のリニアグラジエントでカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、『トヨパール HW-55』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (ゲル量 300ml) を行い、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。

【0104】トレハロース遊離酵素の精製は、『DEAE-トヨパール』から溶出したトレハロース遊離酵素活性画分を用いて、上記の非還元性糖質生成酵素の精製方法と同様に、2M 硫酸を含む緩衝液に対して透析し、次いで疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【0105】精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を、非還元性糖質生成酵素の場合は表 11 に、本発明のトレハロース遊離酵素の場合は表 12 に示す。

【0106】

【表 11】

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養液	28,500		100
破碎後の上清	22,900	0.12	80
硫酸塩析後の透析液	21,100	0.43	74
イオン交換カラム溶出液	15,200	6.2	53
疎水カラム溶出液	7,950	101	28
ゲル濾過溶出液	5,980	197	21

【0107】

【表 12】

工程	トレハロース遊離 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養液	37,400		100
破碎後の上清	31,500	0.17	84
硫酸塩析後の透析液	29,200	0.60	78
イオン交換カラム溶出液	25,400	5.3	68
疎水カラム溶出液	18,700	98.5	50
ゲル濾過溶出液	11,600	240	31

【0108】表11及び表12の工程でそれぞれゲル濾過溶出液として得られた、精製非還元性糖質生成酵素標品及び精製トレハロース遊離酵素標品をポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度7.5%)を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0109】

【実験16 トレハロース遊離酵素の性質】実験15の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度10%)を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本パイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約58,000乃至68,000ダルトンであった。

【0110】精製酵素標品をポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.3乃至4.3であった。

【0111】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図10(温度の影響)、図11(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、30分間反応で、45℃付近、至適pHは、40℃、30分間反応で、約6.0乃至7.5であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図12(温度安定性)、図13(pH安定性)に示した。本酵素の熱安定性は約40℃付近までであり、pH安定性は約5乃至10であった。

【0112】

【実験17  $\alpha$ -グリコシルトレハロースからのトレハ

ロースの調製】基質として用いる $\alpha$ -グリコシルトレハロースは、実験4の方法に従って調製した。即ち、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースから選ばれる還元性澱粉部分分解物の20%水溶液に実験15の方法で得られた精製非還元性糖質生成酵素標品を基質固形物グラム当たりそれぞれ2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、常法に従って、加熱失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮し、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質の高純度標品を調製した。得られた高純度標品のうち、グルコシルトレハロース標品の純度は97.6%で、マルトシルトレハロース標品の純度は98.6%で、マルトトリオシルトレハロース標品の純度は99.6%で、マルトテトラオシルトレハロース標品の純度は98.3%で、マルトペンタオシルトレハロース標品の純度は98.1%であった。

【0113】上記5種の非還元性糖質( $\alpha$ -グリコシルトレハロース)の20%水溶液を調製し、それぞれに実験15で得られた精製トレハロース遊離酵素を基質固形物グラム当たり2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、『ワコービーズ WB-T-330』を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。対照として、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースに精製トレハロース遊離酵素を同様に作用させ、高速液体クロマトグラフィーで分析した。それらの結果を表13に示す。

【0114】

【表13】

基質	反応物	HPLC 溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコシル トレハロース	トレハロース	27.4	17.5
	グルコース	33.8	6.5
	グルコシル トレハロース	23.3	76.0
マルトシル トレハロース	トレハロース	27.4	44.3
	マルトース	28.7	44.4
	マルトシル トレハロース	21.6	11.3
マルトトリオシル トレハロース	トレハロース	27.4	39.5
	マルトトリオース	25.9	60.0
	マルトトリオシル トレハロース	19.7	0.5
マルトテトラオシル トレハロース	トレハロース	27.4	34.2
	マルトテトラオース	24.1	65.5
	マルトテトラオシル トレハロース	18.7	0.3
マルトペンタオシル トレハロース	トレハロース	27.4	29.1
	マルトペンタオース	22.6	70.6
	マルトペンタオシル トレハロース	17.8	0.3
マルトトリオース	マルトトリオース	25.9	100
マルトテトラオース	マルトテトラオース	24.1	100
マルトペンタオース	マルトペンタオース	22.6	100
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	21.8	100
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	21.0	100

【0115】表13の結果から明らかなように、

(1) トレハロース遊離酵素は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースのトレハロース部分とグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度が1以上の還元性糖質とを生成する。

(2) マルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用をうけない。

これらの結果から、本発明のトレハロース遊離酵素は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースのトレハロース部分とその他のグリコシル部分との間の結合を極めて特異的に加水分解し、トレハロースを遊離する全く新しい作用機構の酵素であると判断される。

【0116】次いで、それぞれの反応物からトレハロースを精製するため、脱色、脱塩、濃縮し、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を用いたカラム分画を行い、トレハロース含量97%以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を濃縮して濃度約

40

65%にし、25℃で2日間放置して含水トレハロース結晶を晶出させ、分蜜し、真空乾燥して、トレハロース含量99%以上の高純度標品を調製した。原料基質に対するそれぞれの収率は、固形物換算で、グルコシルトレハロースから9.5%、マルトシルトレハロースから14.9%、マルトトリオシルトレハロースから16.0%、マルトテトラオシルトレハロースから18.5%、マルトペンタオシルトレハロースから17.7%であった。得られたそれぞれの高純度トレハロース標品を用いて、市販の試薬トレハロース（和光薬工業株式会社販売）を標準品として、融点、融解熱、比旋光度、赤外線吸収スペクトル、粉末X線回折パターン及びブタ腎臓由来トレハラーゼでの分解性について比較したところ、調製したすべての高純度トレハロース標品は、融点97.0±0.5℃、融解熱57.8±1.2KJ/mole、比旋光度+182±1.1°で、試薬トレハロースの実測値とよく一致し、また、赤外線吸収スペクトル及

50

び粉末X線回折パターンについても、試薬トレハロースのスペクトル又はパターンとよく一致した。更に、ブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社販売）によって、高純度トレハロース標品は試薬トレハロースと同様にグルコースに分解された。以上の結果から明らかなように、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースに本発明のトレハロース遊離酵素を作用させ生成した糖質はトレハロースであると確認された。

## 【0117】

【実験18 還元性澱粉部分分解物からのトレハロースの調製】5%ワキシコーンスターチ懸濁液を加熱糊化させた後、pH4.5、温度50℃に調整し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当り4,000単位の割合になるように加え、20時間反応させた。その反応液をオートクレーブ（120℃、10分間）し、次いで60℃に冷却し、これを東ソー株式会社製『トヨパール HW-50S』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量750ml）でグ

ルコース重合度35乃至10の還元性澱粉部分分解物を調製した。

【0118】得られた還元性澱粉部分分解物、又はグルコース重合度3のマルトトリオースを、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で1%濃度に調整し、これに実験15の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素標品及び精製トレハロース遊離酵素標品をそれぞれ基質固形物当り4単位の割合で加え、40℃で24時間作用させた後、一部を採り、脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。

【0119】残りの反応液は、更に、50℃、pH4.5に調整した後、グルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製）を基質固形物当り50単位の割合で加え、24時間作用させ、同様に脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。それらの結果を表14に示す。

## 【0120】

## 【表14】

還元性部分分解物の グルコース重合度	反応物	組成比 ( % )	
		非還元性 質生成酵 素およびトレハロース 遊離酵素反応後	グルコアミラ ーゼ反応後
34. 1	トレハロース	80. 8	83. 5
	グルコース	0. 2	16. 5
	還元性オリゴ糖	14. 4	0. 0
	グリコシル トレハロース	4. 6	0. 0
26. 2	トレハロース	79. 7	82. 5
	グルコース	0. 2	17. 5
	還元性オリゴ糖	15. 3	0. 0
	グリコシル トレハロース	4. 8	0. 0
18. 1	トレハロース	77. 7	80. 7
	グルコース	0. 2	19. 3
	還元性オリゴ糖	17. 0	0. 0
	グリコシル トレハロース	5. 1	0. 0
15. 2	トレハロース	75. 0	78. 5
	グルコース	0. 3	21. 5
	還元性オリゴ糖	18. 6	0. 0
	グリコシル トレハロース	6. 1	0. 0
10. 0	トレハロース	66. 1	70. 1
	グルコース	0. 3	29. 9
	還元性オリゴ糖	27. 6	0. 0
	グリコシル トレハロース	7. 7	0. 0
3 ( マルト トリオース )	トレハロース	4. 2	20. 8
	グルコース	2. 1	79. 2
	マルトトリオース	65. 0	0. 0
	グリコシル トレハロース	28. 7	0. 0

(注) 表中、グリコシルトレハロースは、末端にトレハロース構造を有する  
グルコース重合度が3以上の非還元性糖質を意味する。

【0121】表14に示すように、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させた後のトレハロース生成率は、グルコース重合度3のマルトトリオースでは4. 2%と低い値であったが、グルコース重合度10乃至34. 1の澱粉部分分解物では66. 1乃至80. 8%の高い値が得られた。また、原料の還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が高い程、得られるトレハロース純度が高いことも判明した。更に、該両酵素を作用させた反応液にグルコアミラーゼを作用させ、残存する末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質をトレハロースとグルコースとに分解することにより、生成するトレハロース純度がより高まることも判明した。

【0122】

【実験19 メイラード反応】実験17の方法で得られた高純度トレハロース標品（純度99. 5%）の10%

とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液（pH7. 0）を含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、グルコース、マルトースを用いて、同様に処理し、480nmにおける吸光度を測定した。結果を表15に示す。

【0123】

【表15】

糖質標品	着色度（480nm）
トレハロース（本発明）	0. 006
グルコース（対照）	1. 671
マルトース（対照）	0. 926

【0124】表15の結果から明らかなように、トレハロース標品は、メイラード反応による着色度は僅かであ

り、グルコースやマルトースの着色度の僅か 0.4 乃至 0.6 % 程度であり、本発明のトレハロース標品はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが判明した。従って、本糖質は、アミノ酸と混合しても、アミノ酸を損なうことが少ない糖質である。

#### 【0125】

【実験 20 生体内での利用試験】厚治等が、『臨床栄養』、第 41 巻、第 2 号、第 200 乃至 208 頁 (1972 年) で報告している方法に準じて、実験 17 の方法で得られた高純度トレハロース標品 (純度 99.5%) 10 30g を 20w/v % 水溶液とし、これをボランティア 6 名 (健康な 26 才、27 才、28 才、29 才、30 才、31 才の男性) にそれぞれ経口投与し、経時的に採血して、血糖値及びインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値ともに、投与後、約 0.5 乃至 1 時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸收、代謝利用されて、エネルギー源になることが判明した。

#### 【0126】

【実験 21 急性毒性試験】マウスを使用して、実験 17 の方法で得られた高純度トレハロース標品 (純度 99.5%) を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、その LD50 値は、50g/

kg 以上であった。

#### 【0127】

【実験 22 アルスロバクター・スピーシーズ Q36 からのトレハロース遊離酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 (FERM BP-4316) を用いた以外は、実験 14 と同様に、ファーマンターで約 72 時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約 1.3 単位/ml で、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約 1.8 単位/ml であった。実験 14 と同様にして菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約 0.5 単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約 0.5 単位/ml 認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約 0.8 単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約 1.3 単位/ml 認められた。

#### 【0128】

【実験 23 酵素の精製】実験 22 の方法で得られた培養液約 18l を用いて、実験 15 と同様の方法で精製した。精製の各工程結果は非還元性糖質生成酵素の場合は表 16 に、トレハロース遊離酵素の場合は表 17 にまとめた。

#### 【0129】

#### 【表 16】

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養液	23,700		100
破碎後の上清	22,400	0.15	95
硫酸塩析後の透析液	20,200	0.51	85
イオン交換カラム溶出液	15,100	6.5	64
疎水カラム溶出液	8,450	115	36
ゲル濾過溶出液	6,120	217	26

#### 【0130】

#### 【表 17】

工程	トレハロース遊離 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養液	32,500		100
破碎後の上清	30,100	0.19	93
硫酸塩析後の透析液	25,400	0.72	78
イオン交換カラム溶出液	22,700	22.3	70
疎水カラム溶出液	15,200	215	47
ゲル濾過溶出液	11,600	497	36

【0131】表 16 及び表 17 の工程で、それぞれゲル 50 濾過溶出液として得られた精製非還元性糖質生成酵素及



び精製トレハロース遊離酵素を、実験 15 の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた両精製酵素は電気泳動的に単一な純度の高い標品であった。

#### 【0132】

【実験 24 酵素の性質】実験 23 の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素を、実験 16 の場合と同様に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約 57,000 乃至 67,000 ダルトンであった。また、本酵素の等電点を実験 3 の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、等電点は 3.6 乃至 4.6 であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pH の影響、及び本酵素の温度安定性、pH 安定性について、実験 16 の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図 14 に、pH の影響を図 15 に、温度安定性を図 16 に、pH 安定性を図 17 に示した。

【0133】図から明らかなように酵素の至適温度は 45℃ 付近、至適 pH は約 6.0 乃至 7.5 である。温度安定性は 45℃ 付近までであり、pH 安定性は約 5.0 乃至 10.0 である。

#### 【0134】

【実験 25  $\alpha$ -グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製】実験 23 の方法で得られた精製酵素を用

いて、実験 17 の方法に従って、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11 由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースからトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0135】

【実験 26 公知微生物からのトレハロース遊離酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明のトレハロース遊離酵素産生能の確認されたブレバクテリウム・ヘロボルム ATCC 11822 及びマイクロコッカス・ロゼウス ATCC 186 を、実験 14 の場合と同様にファーメンターで 27℃ で 72 時間培養した。それぞれの培養液約 18 l を用いて、実験 15 の場合と同様に、培養液を破碎装置で処理し、その遠心上清を回収し、続いて、硫酸塩析、透析、イオン交換カラムクロマトグラフィーし、得られた部分精製酵素標品の性質を調べた。これらの結果を、前述のリゾビウム・スピーシーズ M-11 及びアルスロバクター・スピーシーズ Q36 の場合とともに表 18 にまとめた。

#### 【0136】

#### 【表 18】

微生物名	イオン交換カラム 溶出液 (単位)	至適温度	至適 pH	温度安定性	pH 安定性
ブレバクテリウム・ ヘロボルム ATCC 11822	6,070	40℃ 付近	約 6.5 乃至 8.8	40℃ 付近まで	約 5.5 乃至 9.5
マイクロコッカス・ ロゼウス ATCC 186	3,010	35℃ 付近	約 8.8	30℃ 付近まで	約 6.5 乃至 7.2
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	25,400	45℃ 付近	約 6.0 乃至 7.5	40℃ 付近まで	約 5.0 乃至 10.0
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	22,700	45℃ 付近	約 6.0 乃至 7.5	45℃ 付近まで	約 5.0 乃至 10.0

【0137】また、これらの公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験 25 の方法に従って、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11 由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースからトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0138】

【実験 27 培養法によるトレハロース生成に与える糖源の影響】非還元性糖質生成酵素産生能を有し、かつ、トレハロース遊離酵素産生能を有する微生物を、各種糖源を含有せしめた栄養培地に培養し、培養物中のトレハ

ロース収量に与える糖源の影響を調べた。糖源と他の成分とを別滅菌して調製した。糖源 10 w/v %、ペプトン 0.5 w/v %、酵母エキス 0.1 w/v %、リン酸二ナトリウム 0.1 w/v %、リン酸一カリウム 0.1 w/v % 及び水からなる液体培地を無菌的に pH 7.0 に調整し、この 50 ml を 500 ml 容三角フラスコにとり、これにアルスロバクター・スピーシーズ Q36 (FERMBP-4316) を接種し、27℃、130 r. p. m. で 72 時間培養した。糖源としては、グルコース、フラクトース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトテトラオース高含有水飴、株式会社林原商事販売『テト

ラップ』(DE約30)及び粉末水飴、松谷化学工学株式会社販売『パインデックス#3』(DE25)を用いた。培養物は、遠心分離して、上清に含まれるトレハロース含量(mg/ml)を高速液体クロマトグラフィー

で測定した。結果は、表19に示す。

【0139】

【表19】

糖 源	トレハロース含量(mg/ml)
グルコース	1.5
フラクトース	1.8
マルトース	2.6
シュクロース	2.3
マルトリオース	18.4
マルトテトラオース	39.7
マルトペンタオース	46.2
マルトテトラオース 高含有水飴(DE30)	32.7
水飴(DE25)	34.4

【0140】表19の結果から明らかなようにグルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物が、トレハロース収量が高く、トレハロース生産に好都合であることが判明した。

【0141】

【実験28 培養法によるトレハロース生成に与える還元性澱粉部分分解物と酵素の影響】非還元性糖質生成酵素産生能を有し、かつトレハロース遊離酵素産生能を有する微生物を、栄養培地に培養するに際し、還元性部分分解物とともに澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを含有せしめた培地に培養し、培養物中のトレハロース収量に対する影響を調べた。実験27の方法に準じて、糖源として、グルコースを3%含有せしめた栄養培地にアルスロバクター・スピーシーズQ36を24時間に培養し、これに、糖源として別に調製した還元性澱粉部分分解物を終末10w/v%濃度になるように加えるとともに澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを加えて、更に48時間培養を続けた。糖源としての還元性澱粉部分分解物は、濃度20%のとうもろこし澱粉乳に炭酸カルシウムを0.1%加え

てpH6.5に調整した後、これに $\alpha$ -アミラーゼ、ノボ社販売『ターマミール』を澱粉当たり0.1乃至2.0%を加え、95℃で15分間反応させ、120℃にオートクレーブして10分間保って、DE2.5乃至20.5の液化溶液とし、これを急冷したものを調製し、これに培地成分を加えて栄養培地を調製し、これを前記の培養24時間目の培養中の培地に等容量加えて培養を続けた。

【0142】培養液に添加する酵素としては、澱粉枝切酵素イソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)を澱粉グラム当たり1,000単位及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を澱粉グラム当たり10単位を用いた。対照としては、糖源を追加しないもの及び酵素を添加しないものの試験をした。培養物を遠心分離し、上清に含まれるトレハロース含量(mg/ml)を高速液体クロマトグラフィーで測定した。結果は表20に示す。

【0143】

【表20】

糖 源	$\alpha$ -アミラーゼ 澱粉当たり (%)	D E	酵素の添加			
			無	D	C	D + C
有	0. 1	2. 5	1 8	7 6	7 1	8 0
	0. 4	4. 8	2 0	6 5	6 2	7 1
	0. 6	7. 8	2 1	5 7	5 2	6 3
	1. 0	1 2. 5	2 1	5 2	4 7	5 6
	1. 2	1 4. 8	2 3	4 5	4 1	5 1
	1. 5	1 7. 3	1 8	3 9	3 7	4 7
	2. 0	2 0. 5	1 2	3 5	3 3	4 5
無	-	-	2	2	2	2

(注) 表中、糖源は還元性澱粉部分分解物を意味し、Dは、澱粉枝切酵素を意味し、Cは、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを意味する。

【0144】表20の結果から明らかなように、培養液に還元性澱粉部分分解物とともに澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを併用したものがトレハロース収量が高く、トレハロース生産に有利であることが判明した。とりわけ、還元性澱粉部分分解物が澱粉をDE15未満に液化したものを糖源として培養し、これに澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを作用させたものが好適であることが判明した。

【0145】以下、本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法を実施例Aで、該糖質を含有せしめた組成物を実施例Bで示す。

【0146】

【実施例A-1】馬鈴薯澱粉を濃度約20%の澱粉乳とし、これに蔞酸を0.3%加えてオートクレープし、冷却し、炭酸カルシウムでpH5.5に中和して、DE約12の液化物を調製した。糖源として、前述の液化物を濃度10w/v%使用した以外は、実験27に準じて調製した栄養培地をファーメンターにとり、これに、非還元性糖質生成酵素産生能を有するクルトバクテリウム・シトレウム (*Curtobacterium citreum*) IFO15231の種培養物を1v/v%植菌し、27℃で72時間通気攪拌培養した。この培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を、95℃に加熱して酵素を失活させた後、濃縮し、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物当たり約90%の収率で得た。本品は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースを含むDE約8の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0147】

【実施例A-2】タピオカ澱粉を濃度約25%澱粉乳とし、これに $\alpha$ -アミラーゼ、ナガセ生化学工業株式会社製『ネオスピターゼ』を澱粉グラム当たり0.1%加え、85乃至90℃で約20分間反応させ、次いで120℃にオートクレープし、急冷してDE約4の液化物を得、これにブルナーゼ (株式会社林原生物化学研究所販売) 澱粉グラム当たり100単位及びマルトテトラオース生成アミーゼ (株式会社林原生物化学研究所製) を澱粉グラム当たり5単位加え、pH6.5、温度50℃で20時間反応させ、マルトテトラオース高含有糖化物を得た。本反応液を、常法に従って、加熱して酵素を失活させた後、脱色、脱塩して精製し、濃度約60%糖液を調製した。糖源として、前述のマルトテトラオース高含有糖物を濃度15w/v%使用した以外は、実験27に準じて調製した栄養培地をファーメンターにとり、これに実施例A-1と同様にクルトバクテリウム・シトレウム IFO15231を27℃で72時間培養した。この培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を、濃縮し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃度約60%に濃縮した。本濃縮液を原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、カルシウム型強酸性カチオン交換樹脂、東京有機化学工業株式会社製『XT-1016』を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長20mとした。カラム内温度を55℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.2で流して分画し、非還元製糖質高含有のグルコース重合度4乃至6の画分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当たり63%の収率で得た。本品は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースを有する非還元性糖質を含むDE5.4の

低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0148】

【実施例 A-3】とうもろこし澱粉を濃度約 30% の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム 0.1% 加え、pH 6.5 に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ、ノボ社製『ターマイル 60 L』を澱粉グラム当たり 0.2% 加え、95℃ で約 15 分間反応させ、次いで 120℃ にオートクレイブし、急冷して DE 約 4 の液化物を調製した。栄養培地を、糖源 10w/v%、ペプトン 0.5w/v% に代えて、マルトース 2w/v%、塩化アンモニウム 0.2w/v% 及び硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05w/v% にした以外は、実験 27 に準じて調製してファーマンターにとり、クルトバクテリウム・シトレウム IFO 15231 を 27℃ で 30 時間培養した。これに、糖源として前述の液化物を固形物濃度 10w/v% になるように加え、更に糖源グラム当たり、イソアミラーゼ 300 単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所販売）2 単位、更に界面活性剤（アルキルフェノール・ポリオキシエチレンエーテル、和光純薬工業株式会社販売『Triton X-100』）0.2v/v% 及び培養液 1 l 当たり卵白リゾチーム 10mg を加えて、48 時間培養を続けた。本培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を加熱して酵素を失活させた後、冷却し、これに  $\beta$ -アミラーゼ澱粉グラム当たり 2 単位加えて pH 5.5、温度 55℃ で 16 時間反応させた。本反応液を、加熱して酵素を失活させた後、濃縮し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度約 70% のシラップを固形物当たり約 90% の収率で得た。本品は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドなどの非還元性糖質を含む低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0149】

【実施例 A-4】実施例 3 の方法で得たシラップを濃度約 55% にして原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、実施例 A-2 の方法に準じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行って、非還元性糖質高含有のグルコース重合度 3 乃至 6 の画分を採取し、精製、濃縮し、噴霧乾燥して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当たり 38% の収率で得た。本品は、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質及び  $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドなどの非還元性糖質を多量含む DE 8 の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味

改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0150】

【実施例 A-5】実施例 A-3 の方法で得た培養物を濾過して不溶物を除去し、濃縮後得られる濾液を加熱して酵素を失活させた後、冷却し、これにグルコアミラーゼを糖源グラム当たり 10 単位加えて pH 5.0、温度 55℃ で 10 時間反応させた。本反応液には、糖組成でトレハロースを約 66% 含有していた。本反応液を加熱して酵素を失活させた後、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度約 85% にして助晶機にとり、攪拌しつつ徐冷して助晶し、これをプラスチック製バットに取り出し、室温で 2 日間放置し、晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎してトレハロース含水結晶粉末を、原料の澱粉に対して固形物当たり 92% の収率で得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0151】

【実施例 A-6】タピオカ澱粉を濃度約 30% の澱粉乳とし、これに実施例 A-2 の方法に準じて、 $\alpha$ -アミラーゼを作用させて DE 5 の液化物を調製した。栄養培地を糖源 10w/v%、ペプトン 0.5w/v% に代えて、マルトース 2w/v%、塩化アンモニウム 0.2w/v% 及び硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05w/v% にした以外は、実験 27 に準じて調製してファーマンターにとり、これに非還元性糖質生成酵素産生能を有するテラバクター・ツメスセンス (*Terrabacter tumescens*) IFO 12960 の種培養物を 1v/v% 植菌し、27℃ で 30 時間通気攪拌培養した。これに、糖源として、前述の液化物を濃度 20w/v% になるように加え、更に、糖源固形物グラム当たり、実験 2 の方法で得た精製トレハロース遊離酵素を 5 単位、イソアミラーゼ 500 単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ 10 単位、更に培養液 1 l 当たり卵白リゾチーム 50mg を加えて培養を 48 時間続けた。培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を加熱して酵素を失活させた。本液には、糖組成でトレハロースを約 78% 含有していた。本液を、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり約 55% の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

## 【0152】

【実施例 A-7】実施例 A-6 の方法で得た加熱失活した溶液に、グルコアミラーゼを基質グラム当たり 10 単位加え、pH 5.0、温度 50℃ で 10 時間反応させた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃度約 70% に濃縮した後、助晶機にとり攪拌しつつ徐冷して助晶し、晶出率約 40% のマスクットを得た。本マスクットを乾燥塔上のノズルより 150 kg/cm<sup>2</sup> の高圧にて噴霧し、同時に乾燥塔の上部より 85℃ の熱風を送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を捕集した。コンベアの下より 45℃ の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ 10 時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を、原料の澱粉に対して、固形物当たり約 75% の収率で得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

## 【0153】

【実施例 A-8】とうもろこし澱粉を濃度 33% の澱粉乳とし、これに実施例 A-3 の方法に準じて、 $\alpha$ -アミラーゼを作用させて DE 約 4 の液化物を調製した。栄養培地を糖源 10w/v%、ペプトン 0.5w/v% に代えて、グルコース 2w/v%、硝酸アンモニウム 0.2w/v% 及び硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05w/v% にした以外は、実験 27 に準じて調製してファーマンターにとり、これに非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素産生能を有するリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) M-11 (FERM BP-4130) の種培養物を 1v/v% 植菌し、27℃ で 24 時間通気攪拌培養した。これに糖源として、前述の液化物を濃度 25w/v% になるように加え、更に、糖源固形物グラム当たり、イソアミラーゼ 500 単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ 10 単位、更に、界面活性剤『Tween 40』を 0.2v/v% 加えて培養を 48 時間続けた。培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を加熱して酵素を失活させた。本液には、糖組成でトレハロースを約 82% 含有していた。常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスクットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を糖源固形物当たり約 64% の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

## 【0154】

【実施例 A-9】実施例 A-8 の方法で得た培養物の濾

液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度 55% のシラップを得た。本糖液を原糖液とし、トレハロース含量を高めるため、カルシウム型強酸性カチオン交換樹脂、ダウケミカル社製『ダウエックス 99』（架橋度 6%）を用いて、実施例 A-2 と同様にカラムクロマトグラフィーにかけ、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有画分は、固形物当たりトレハロースを 97% 含有していた。本高含有画分を、常法に従って、脱色、脱塩精製し、次いで蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約 3.0% のシラップとした。次いで助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースを固形物当たり 1% 加え、120℃ で攪拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、100℃ で 6 時間晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して水分約 0.3% の無水結晶トレハロース粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して、固形物当たり約 85% の収率で得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、又は加工中間物などの含水物の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

## 【0155】

【実施例 A-10】栄養培地を、実験 27 の方法に準じて調製してファーマンターにとり、これに非還元性糖質生成酵素産生能及びトレハロース遊離酵素産生能を有するアルスロバクター・スピーシーズ (*Arthrobacter* sp.) Q-36 (FERM BP-4316) の種培養物を 1v/v% 植菌し、27℃ で 24 時間通気攪拌培養した。これに糖源として、実施例 A-8 の方法で得た液化物を濃度 20w/v% になるように加え、更に、イソアミラーゼ及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを実施例 A-8 の場合と同様に加えて培養を 24 時間続けた。培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を加熱して酵素失活させ、これにグルコアミラーゼを実施例 A-5 と同様に作用させた。本反応液には、糖組成でトレハロースを約 81% 含有していた。本反応液を加熱して酵素を失活させ、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃度約 75% に濃縮した後、助晶缶にとり、ゆっくり攪拌しつつ徐冷し、約 25℃ まで下げ、マスクットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり 45% の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

## 【0156】

【実施例 B-1 甘味料】実施例 A-7 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 1 重量部に、 $\alpha$ -グリコシルス

デビオシド、東洋精糖株式会社販売『αGスイート』  
0.01重量部及びL-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、味の素株式会社販売『アスパルテム』0.01重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約2倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約1/2に低下している。本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

【0157】

【実施例B-2 ハードキャンディー】濃度55%蔗糖溶液100重量部に実施例A-1の方法で得た非還元性糖質含有シラップ30重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸1重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出、変形も起こらない高品質のハードキャンディーである。

【0158】

【実施例B-3 チョコレート】カカオペースト40重量部、カカオバター10重量部、蔗糖30重量部、実施例A-10の方法で得た高純度トレハロース含水結晶20重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて50℃で2昼夜練り上げる。この間に、レシチン0.5重量部を加え、十分に混和分散させた。次いで、温度調節機で31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、振動機でアワ抜きを行い、10℃の冷却トンネルを20分間くぐらせて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共によく、内部組織も良好で、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。

【0159】

【実施例B-4 チューインガム】ガムベース3重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖4重量部及び実施例A-5の方法で得たトレハロース含水結晶粉末3重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。

【0160】

【実施例B-5 加糖練乳】原乳100重量部に実施例A-3の方法で得た非還元性糖質含有シラップ3重量部及び蔗糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して

製品を得た。本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0161】

【実施例B-6 乳酸菌飲料】脱脂粉乳175重量部、実施例A-2の方法で得た非還元性糖質高含有粉末80重量部及び特開平4-281795号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末50重量部を水1,200重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部接種し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

【0162】

【実施例B-7 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対して、実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶50重量部、蔗糖10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、プルラン0.5重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-6の方法で得たトレハロース高含有シラップをバインダーとしてスプレーし、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

【0163】

【実施例B-8 カスタードクリーム】コーンスターチ100重量部、実施例A-1の方法で得た非還元性糖質含有シラップ100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部及び食塩1重量部を十分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0164】

【実施例B-9 ういろうの素】米粉90重量部に、コーンスターチ20重量部、蔗糖40重量部、実施例A-5の方法で得たトレハロース含水結晶粉末80重量部及びプルラン4重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。本品は、照り、口当りも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【0165】

【実施例B-10 あん】原料あずき10重量部に、常

法に従って、水を加えて煮沸し、液切り、あく抜きして、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約 2 1 重量部を得た。この生あんに、蔗糖 1 4 重量部、実施例 A - 3 の方法で得た非還元性糖質含有シラップ 5 重量部及び水 4 重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約 3 5 重量部得た。本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として好適である。

【0166】

【実施例 B - 1 1 パン】小麦粉 1 0 0 重量部、イースト 2 重量部、砂糖 5 重量部、実施例 A - 4 の方法で得た非還元性糖質含有粉末 1 重量部及び無機フード 0. 1 重量部を、常法に従って、水でこね、中種を 2 6℃で 2 時間発酵させ、その後 3 0 分間熟成し、焼き上げた。本品は、色相、すだちとともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

【0167】

【実施例 B - 1 2 ハム】豚もも肉 1, 0 0 0 重量部に食塩 1 5 重量部及び硝酸カリウム 3 重量部を均一にすり込んで、冷室に 1 昼夜堆積する。これを水 5 0 0 重量部、食塩 1 0 0 重量部、硝酸カリウム 3 重量部、実施例 A - 4 の方法で得た非還元性糖質含有粉末 4 0 重量部及び香辛料からなる塩漬液に冷室で 7 日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0168】

【実施例 B - 1 3 粉末ペプチド】濃度 4 0 % 食品用大豆ペプチド溶液、不二製油株式会社製『ハイニース S』1 重量部に、実施例 A - 6 の方法で得た高純度トレハロース含水結晶 2 重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、5 0℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は、風味良好で、ブレックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【0169】

【実施例 B - 1 4 粉末味噌】赤味噌 1 重量部に実施例 A - 9 の方法で得た無水結晶トレハロース粉末 3 重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、離型して 1 個当たり約 4 g の固形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。また、固形味噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

【0170】

【実施例 B - 1 5 粉末卵黄】生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で 6 0 乃至 6 4℃で殺菌し、得ら

れる液状卵黄 1 重量部に対して、実施例 A - 9 の方法で得た無水結晶トレハロース粉末 4 重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。本品は、ブレックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

10 【0171】

【実施例 B - 1 6 化粧用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール 2 重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5 重量部、実施例 A - 2 の方法で得た非還元性糖質高含有粉末 2 重量部、 $\alpha$ -グリコシル ルチン 1 重量部、流動パラフィン 1 重量部、トリオクタン酸グリセリル 1 0 重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これに L - 乳酸 2 重量部、1, 3 - ーブチレングリコール 5 重量部及び精製水 6 6 重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0172】

【実施例 B - 1 7 粉末薬用人参エキス】薬用人参エキス 0. 5 重量部に実施例 A - 9 の方法で得た無水結晶トレハロース粉末 1. 5 重量部を混捏した後、バットに移し、2 日間放置してトレハロース含水結晶に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末薬用人参エキスを得た。本品を適量のビタミン B 1 及びビタミン B 2 粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。本品は、疲労回復剤、強壮、強精剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

【0173】

【実施例 B - 1 8 固体製剤】ヒト天然型インターフェロン -  $\alpha$  標品（株式会社林原生物化学研究所製）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン -  $\alpha$  抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン -  $\alpha$  を吸着させ、安定剤であるウシ血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pH を変化させて、ヒト天然型インターフェロン -  $\alpha$  を実施例 A - 6 の方法で得た高純度トレハロース含水結晶を 5 % 含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、約 2 0 倍量の無水結晶マルトース粉末、株式会社林原商事販売『ファイントース』に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1 錠（約 2 0 0 mg）当たりヒト天然型インターフェロン -  $\alpha$  を約 1 5 0 単位含有する錠剤を得た。本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人 1 乃至 1 0 錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの



治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、本発明の非還元性糖質と無水結晶マルトースが共に安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【0174】

【実施例 B-19 糖衣錠】重量 150mg の素錠を芯剤とし、これに実施例 A-8 の方法で得た高純度トレハロース含水結晶 40 重量部、プルラン（平均分子量 20 万）2 重量部、水 30 重量部、タルク 25 重量部及び酸

#### 配合

第 2 リン酸カルシウム	45.0 重量部
プルラン	2.95 重量部
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5 重量部
グリセリン	20.0 重量部
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	0.5 重量部
防腐剤	0.05 重量部
実施例 A-5 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末	12.0 重量部
マルチトール	5.0 重量部
水	13.0 重量部

上記の材料を常法に従って混合し、練歯磨を得た。本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。

【0176】

【実施例 B-21 流動食用固体制剤】実施例 A-7 の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末 500 重量部、粉末卵黄 270 重量部、脱脂粉乳 209 重量部、塩化ナトリウム 4.4 重量部、塩化カリウム 1.8 重量部、硫酸マグネシウム 4 重量部、チアミン 0.01 重量部、アスコルビン酸ナトリウム 0.1 重量部、ビタミン E アセテート 0.6 重量部及びニコチン酸アミド 0.04 重量部からなる配合物を調製し、この配合物 25 グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1 袋分を約 150 乃至 300ml の水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

【0177】

【実施例 B-22 輸液剤】実施例 A-10 の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約 10w/v% に溶解し、次いで、常法に従って、精密濾過してパイロジェンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。本品は、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度 10w/v% で血液と等張で、グルコースの場合の 2 倍濃度でエネルギー補給できる。

【0178】

【実施例 B-23 輸液剤】実施例 A-8 の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ酸配合物とがそれぞれ 5w/v%、30w/v% になる

化チタン 3 重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約 230mg になるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末 65 重量部、プルラン 1 重量部及び水 34 重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢の在る外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0175】

【実施例 B-20 練歯磨】

ように水に混合溶解し、次いで実施例 B-22 と同様に精製してパイロジェンフリーとし、更に、プラスチック製バックに充填し施栓して製品を得た。

アミノ酸配合物の組成 (mg/100ml)

L-イソロイシン	180
L-ロイシン	410
L-リジン塩酸塩	620
L-メチオニン	240
L-フェニルアラニン	290
L-スレオニン	180
L-トリプトファン	60
L-バリン	200
L-アルギニン塩酸塩	270
L-ヒスチジン塩酸塩	130
グリシン	340

本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわらず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である。本品は、生体へのエネルギー補給のみならず、アミノ酸補給のためにも有利に利用できる。

【0179】

【実施例 B-24 外傷治療用膏薬】実施例 A-5 の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末 200 重量部及びマルトース 300 重量部に、ヨウ素 3 重量部を溶解したメタノール 50 重量部を加え混合し、更に 10w/v% プルラン水溶液 200 重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治療期間が短縮され、創面もきれいに治る。

【0180】

【発明の効果】上記から明らかなように、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有せしめた栄養培地に、非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を培養することにより、培養物から非還元性糖質を極めて簡便、短時間に製造することができることとなり、非還元性糖質、又は、これを含有する低還元性糖質の工業実施を容易にする。また、該還元性澱粉部分分解物として、澱粉を液化した溶液に澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを栄養培地中で作用させる方法を利用し、微生物として、非還元性糖質生成酵素産生能及びトレハロース遊離酵素産生能を有するものを利用すれば、澱粉からの非還元性糖質、すなわち、 $\alpha$ -グリコシルトレハロース、 $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシド及び／又はトレハロース収量を著しく高め、その工業的実施を容易にする。このようにして得られる $\alpha$ -グリコシルトレハロース、 $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシド及びトレハロースなどの非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質は、安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。とりわけ、トレハロースは非経口的にも使用され、よく代謝利用される。従って、本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0181】本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉から、従来望むべくして容易に得られなかった非還元性糖質、又は、これを含む糖質を工業的に大量かつ安価に提供できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響は、食品、化粧品、医薬品業界は言うに及ばず、農水畜産業、化学工業にも及びこれら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

【図1】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図4】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

【図5】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図6】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図7】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図8】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

【図9】DEAE-トヨパールからの本発明のトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素の溶出パターンを示す図である。

【図10】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図11】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図12】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図13】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

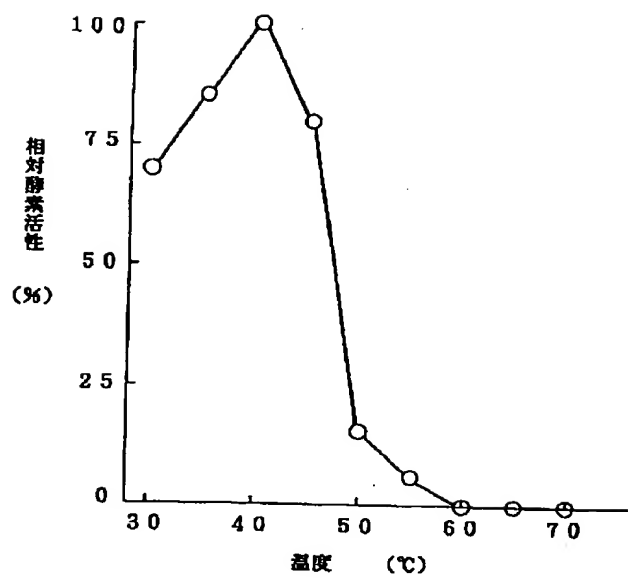
【図14】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図15】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

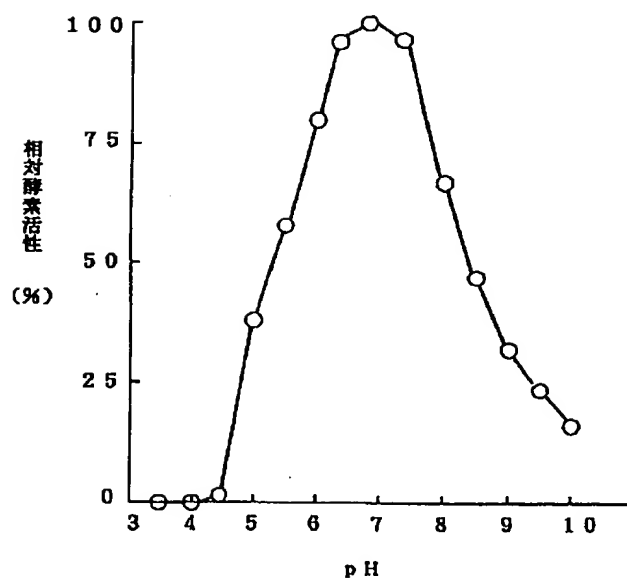
【図16】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図17】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

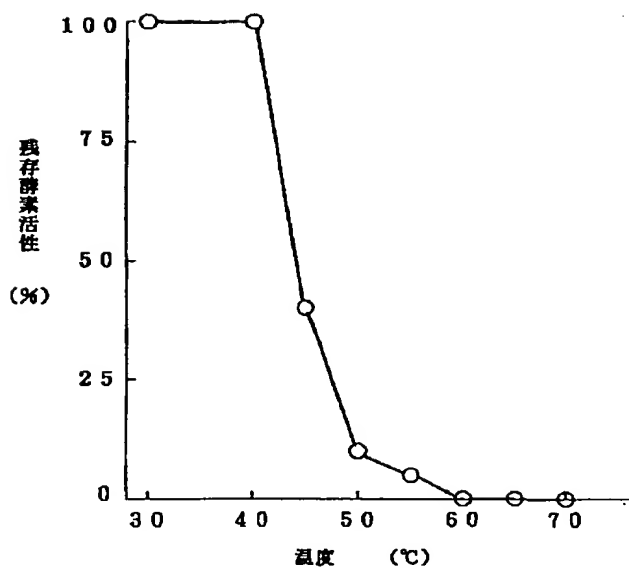
【図1】



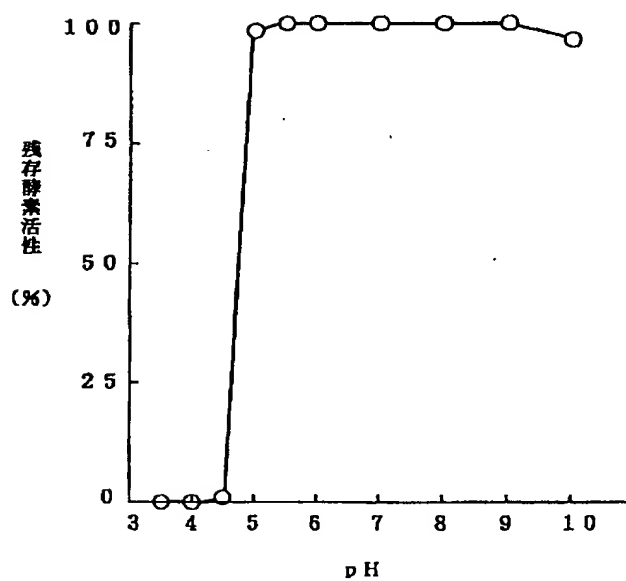
【図2】



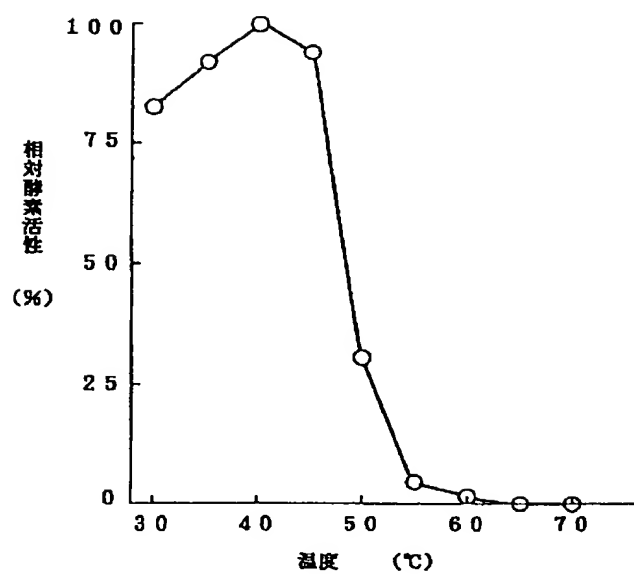
【図3】



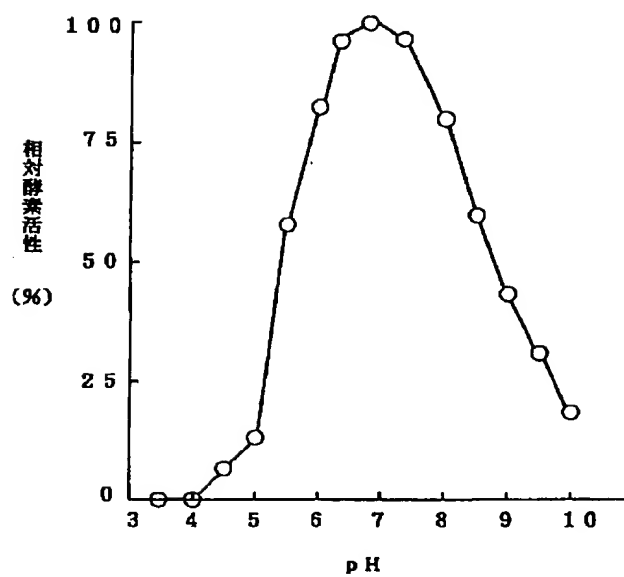
【図4】



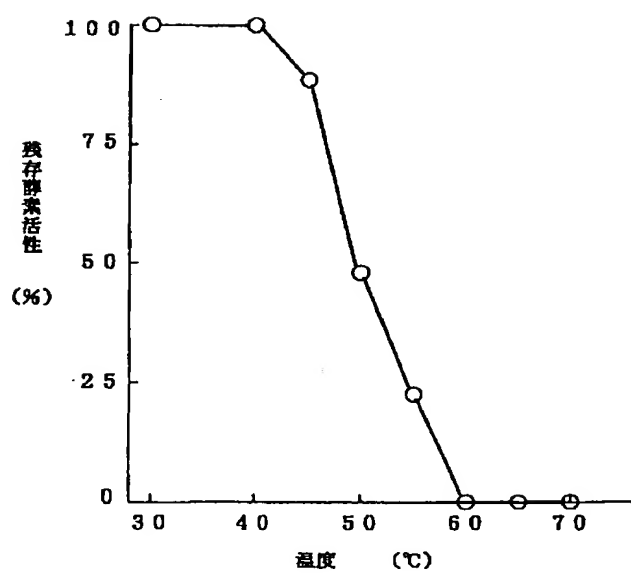
【図5】



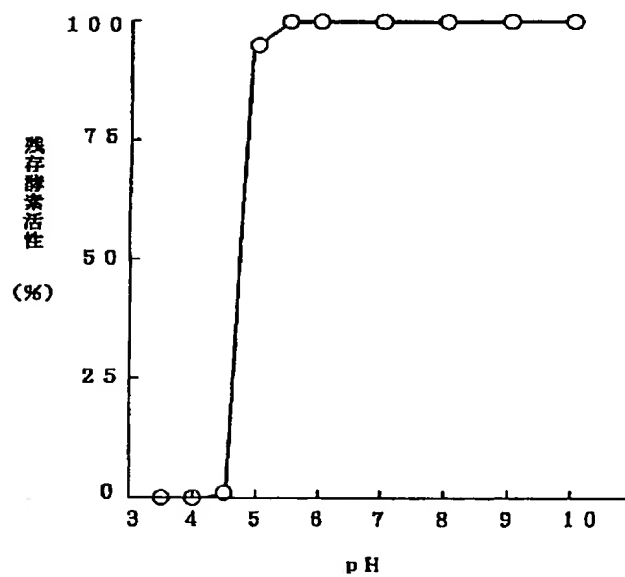
【図6】



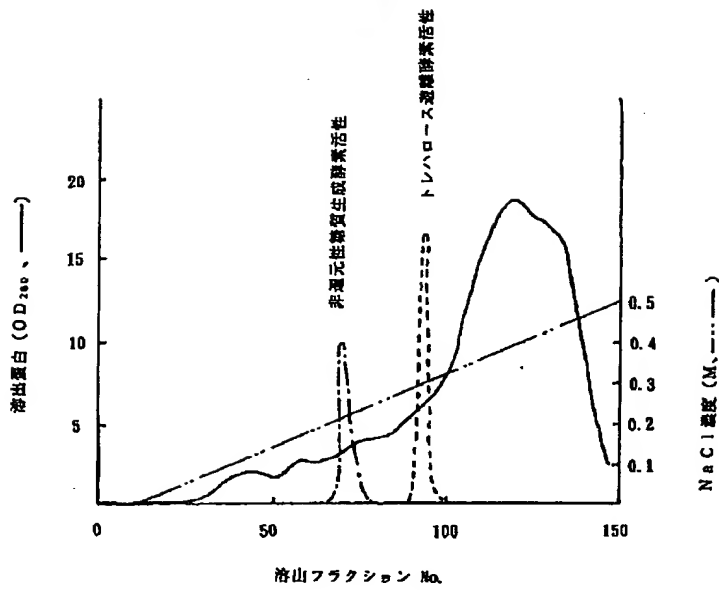
【図7】



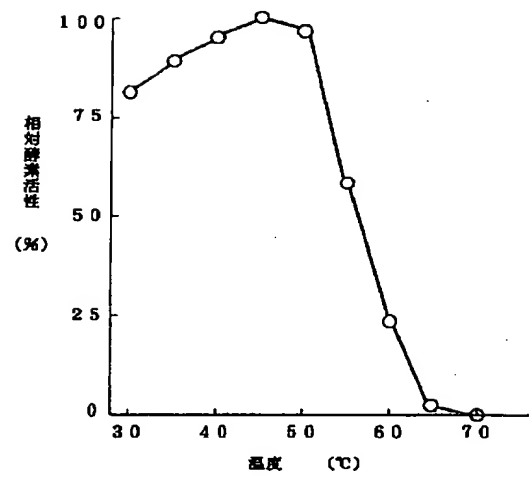
【図8】



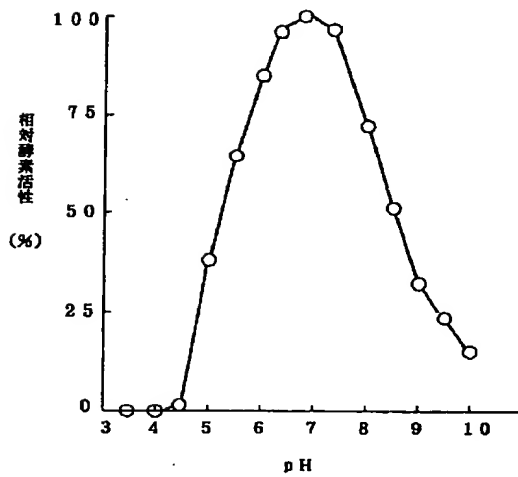
【図9】



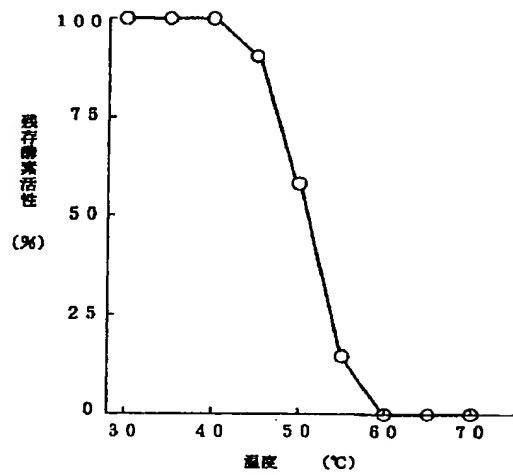
【図10】



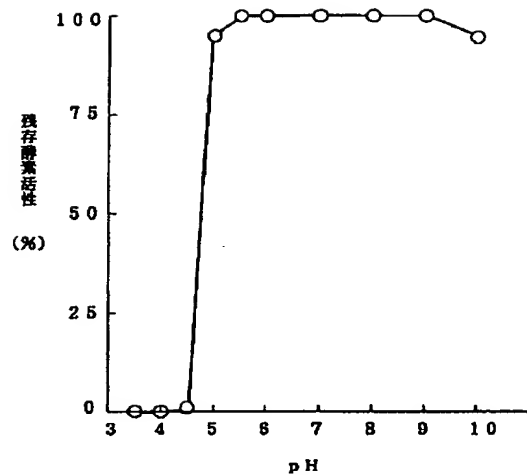
【図11】



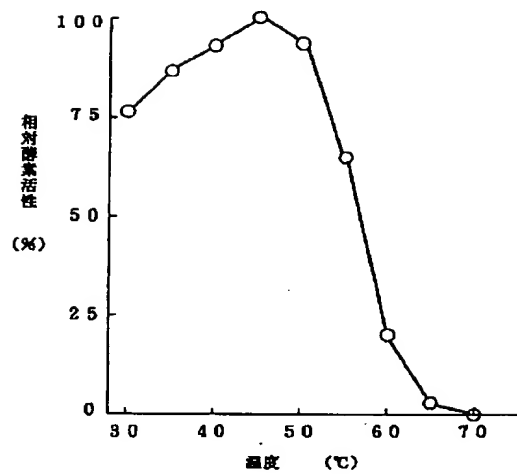
【図12】



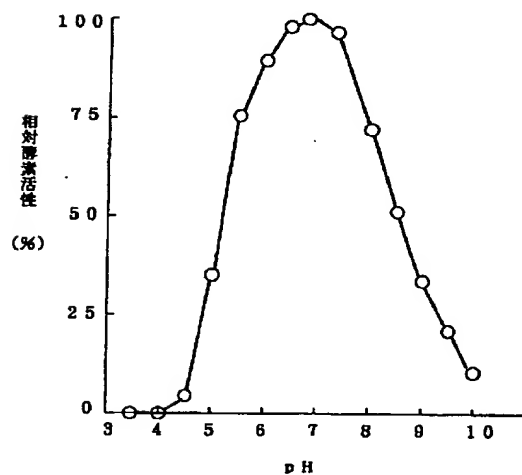
【図 13】



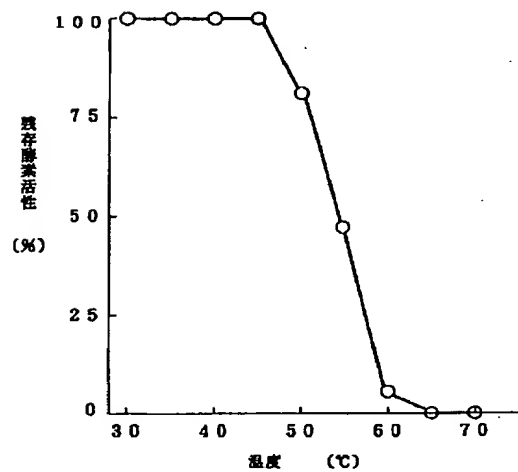
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【図 17】

